9 月 September
2020, 63(9): 1039 - 1047

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

http://www.insect.org.cn
doi: 10.16380/j.kcxb.2020.09.001

近暗散白蚁 β-葡糖苷酶基因 *RpBg7* 的克隆及其在毕赤酵母中的表达

苏丽娟[1], 肖元玺[1], 李 琰[1], 伍志伟[1], 赵鹏飞[1], 楚君鹏[1], 魏纪珍[2], 安世恒[2], 尹新明[2], 宋安东[1,*]

(1. 河南农业大学生命科学学院, 郑州 450002; 2. 河南农业大学植物保护学院, 郑州 450002)

摘要:【目的】白蚁是自然界中利用木质纤维素能力很强的生物,是纤维素酶的天然资源库。本研究旨在挖掘新来源的纤维素酶基因,为生物质能源的高效利用提供新的天然酶。【方法】根据前期蛋白质组测序的结果,利用 PCR 结合 RACE 克隆了近暗散白蚁 *Reticulitermes perilucifugus* β-葡糖苷酶 7(β-glucosidase 7)基因 *RpBg7* cDNA 全长序列;通过生物信息学软件分析了 *RpBg7* 的序列;用表达载体 pPICZαA 在毕赤酵母 *Pichia pastoris* X-33 中表达 RpBg7 蛋白,并用 4-硝基苯基-β-d-吡喃葡萄糖苷(4-nitrophenyl β-d-glucopyranoside, 4pNPG)为底物检测了表达的 RpBg7 蛋白的酶活性。【结果】获得了近暗散白蚁的一个内源性 β-葡糖苷酶 7 基因 *RpBg7*(GenBank 登录号: MN944395),其开放阅读框长 1 485 bp,编码 495 个氨基酸残基。RpBg7 蛋白预测分子量为 57 kD,属于糖苷水解酶 1(glycoside hydrolase 1, GH1)家族,具有保守的碱性氨基酸残基 Glu187 和 Glu394。通过毕赤酵母表达系统成功表达 RpBg7 蛋白。酶活性分析结果表明,毕赤酵母胞外分泌蛋白粗酶液和胞内蛋白粗酶液中 RpBg7 酶活性分别为 4.43 和 7.47 U/mL。【结论】克隆并利用毕赤酵母表达了近暗散白蚁的 GH1 家族的一个 β-葡糖苷酶 7 基因 *RpBg7*,为后期纤维素酶的改造和应用提供了条件。

关键词: 近暗散白蚁; β-葡糖苷酶; 纤维素酶; 毕赤酵母; 木质纤维素

中图分类号: Q965.9　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0454-6296(2020)09-1039-09

Cloning of the β-glucosidase gene *RpBg7* from *Reticulitermes perilucifugus* (Blattariae: Rhinotermitidae) and its expression in *Pichia pastoris*

SU Li-Juan[1], XIAO Yuan-Xi[1], LI Yan[1], WU Zhi-Wei[1], ZHAO Peng-Fei[1], CHU Jun-Peng[1], WEI Ji-Zhen[2], AN Shi-Heng[2], YIN Xin-Ming[2], SONG An-Dong[1,*] (1. College of Life Sciences of Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2. College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract:【Aim】Termites are the organisms with the high efficiency to use lignocellulose in nature, and are the natural resource reservoir of cellulases. This study aims to explore cellulase genes of new sources and to provide new natural enzymes for efficient utilization of biomass energy.【Methods】Based on the previous proteome analysis, the full-length cDNA sequence of β-glucosidase 7 gene (*RpBg7*) was cloned from *Reticulitermes perilucifugus* by using RCR and RACE technology, and the *RpBg7* sequence was analyzed by bioinformatic software. The RpBg7 protein was expressed with expression vector pPICZαA in *Pichia pastoris* X-33, and the enzyme activity of the expressed RpBg7 protein was assayed with 4-

基金项目: 国家自然科学基金项目(31170350); 河南省基础与前沿技术研究项目(142300410150); 河南省高等学校重点科研项目(20A210004)

作者简介: 苏丽娟, 女, 1972 年 2 月生, 河南宜阳人, 博士, 副教授, 研究方向为昆虫生理生化, E-mail: sulijuan816@126.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: songandong@henau.edu.cn

收稿日期 Received: 2020-02-10; 接受日期 Accepted: 2020-04-15

nitrophenyl β-d-glucopyranoside (4pNPG) as the substrate. 【Results】We obtained an endogenous β-glucosidase 7 gene, *RpBg7* (GenBank accession no: MN944395), from *R. perilucifugus*. Its open reading frame is 1 485 bp in length, encoding 495 amino acids. The RpBg7 protein has the predicated molecular weight of 57 kD and belongs to glycoside hydrolase 1 (GH1) family with conservative basic amino acid residues Glu187 and Glu394. The RpBg7 protein was successfully expressed in the *P. pastoris* expression system. The enzyme activity assay results showed that the enzyme activity of RpBg7 in the crude solutions of extracellular secretion proteins and intracellular proteins of *P. pastoris* was 4.43 and 7.47 U/mL, respectively. 【Conclusion】The β-glucosidase 7 gene of GH1 in *R. perilucifugus* was cloned and expressed in *P. pastoris*, providing conditions for the modification and application of cellulases afterwards.

Key words: *Reticulitermes perilucifugus*; β-glucosidase; cellulase; *Pichia pastoris*; lignocellulose

木质纤维素是地球上最丰富和最广泛的生物能源,其结构组分包括 β 链接的聚合纤维素(β-linked polymeric cellulose)、半纤维素、酚醛聚合物木质素和其他一些小分子组件(Ragauskas *et al*., 2005; Sethi *et al*., 2013)。这些组分通过半纤维素的分子黏合,作为支撑骨架包围并加固着纤维素和半纤维素,木质纤维素的这种复杂、致密的结构,导致其木质纤维素解聚效率低(Ragauskas *et al*., 2006; Lange, 2007; Anderson and Akin, 2008; Yang and Wyman, 2008)。由于白蚁可以消化摄入植物材料中高达 99% 的纤维素,白蚁和其肠道微生物是木质纤维素降解酶的宝贵资源,白蚁在消化木质纤维素方面受到越来越多的关注(Ohkuma, 2003; Scharf and Tartar, 2008; Scharf and Boucias, 2010; Ni and Tokuda, 2013; 曹慧芳, 2018; 杜娇等, 2019)。迄今为止,文献报道有 110 多种经过 PCR 扩增再经过异源重组表达的白蚁或共生的消化酶,这些酶来自于 13 种白蚁,主要有黄胸散白蚁 *Reticulitermes speratus* (24%)、台湾乳白蚁 *Coptotermes formosanus* (17%)、北美散白蚁 *Reticulitermes flavipes* (15%)、中脉象白蚁 *Nasutitermes costalis* (11%)、高山象白蚁 *Nasutitermes takasagoensis* (9%)、恒春新白蚁 *Neotermes koshunensis* (6%) 和黄翅大白蚁 *Macrotermes barneyi* (2%)等(杜娇等, 2019; 马玉俊等, 2019);这些重组消化酶中 60% 来源于细菌, 29% 来源于宿主白蚁,11% 来源于共生原生物;这些酶的不同重组表达平台已经应用,其中细菌和酵母应用最多(分别为 47% 和 34%),其次是杆状病毒/昆虫(11%)和真菌(8%)的表达系统。这 110 多种酶中,95% 为糖基水解酶(glycosyl hydrolase, GH), 3% 是酚氧化酶/木质素酶,2% 是酯酶。GH 家族有几个关键家族组成,主要包括 42% GHF9(内切葡聚糖酶),28% GHF5(纤维素酶),11% GHF7(内切葡聚糖酶/外切纤维素酶),9% GHF45(半纤维素酶), 6% GHF1(β-葡糖苷酶),2% GHF11(半纤维素酶)和 1% GHF8 和 GHF10(纤维素酶)(Scharf, 2015)。

白蚁的消化道可分为前肠(foregut)、中肠(midgut)和后肠(hindgut)3 部分。前肠包括嗉囊(crop)和肌胃(gizzard),对白蚁取食的木块进行机械研磨;中肠是主要的消化酶分布和营养物质吸收场所;后肠是整个消化道最大的部分,为众多的肠道共生微生物提供生存环境,这些共生微生物包括细菌、古细菌和原生生物(Ni and Tokuda, 2013)。研究者普遍认为白蚁的木质纤维素降解体系由白蚁自身产生的纤维素酶与肠道共生微生物群(包括肠道共生原生动物和共生细菌)产生的酶系共同组成(Scharf *et al*., 2011; Scharf, 2015)。通过对白蚁纤维素酶、半纤维素酶和木质素酶的来源分析,可以推测出白蚁在摄食木材后,前肠在研磨食物时将纤维二糖水解酶(cellobiohydrolase, EG)和 β-葡糖苷酶(β-glucosidase, BG)与食物混合,EG 水解非结晶区的纤维素,BG 从末端水解出葡萄糖,酶解作用主要在中肠进行;进入后肠后,低等白蚁的共生原生生物产生的 GH5, GH7 和 GH45 家族的 EG 酶、GH3 家族的 BG 酶作用于结晶区的纤维素,高等白蚁则由后肠的共生原核生物产生的酶作用于结晶区的纤维素(Ni and Tokuda, 2013);半纤维素的降解则可能主要依靠共生菌群产生的半纤维素酶;对于木质素,白蚁几乎不能降解,大部分以粪便的方式排出体外(Geib *et al*., 2008; Brune, 2014)。

上述对白蚁木质纤维素酶的研究和开发在一定程度上丰富了工业中降解木质纤维素的混合酶资源的认识,但是目前能够投入生产应用的还远远不够,需要进一步研究和开发利用新的天然纤维素酶,因

此，本研究根据前期蛋白组测序的结果，利用 PCR 结合 RACE 克隆了近暗散白蚁 *Reticulitermes perilucifugus* 的 β-葡糖苷酶 7（β-glucosidase 7）基因 *RpBg*7，通过生物信息学软件分析了近暗散白蚁 *RpBg*7 序列，并对该基因进行了毕赤酵母 *Pichia pastoris* 表达，测定表达的 β-葡糖苷酶 7 的酶活性，为丰富纤维素酶资源，构建新型、高效的木质纤维素转化技术体系提供理论依据和数据支持。

1　材料与方法

1.1　近暗散白蚁采集与鉴定

本研究所用的近暗散白蚁，采自河南省信阳市商城县金刚台（31°48′N，115°2′E）。近暗散白蚁一般生活在未经开发的山林中，以枯木为食，采集白蚁时连同枯木一同带回，放入塑料箱内，置于阴暗处，保持温度 20～35℃、相对湿度 50%～70%。通过白蚁群体中兵蚁的外部形态特征（黄复生等，2000）以及基于白蚁的线粒体 16S rDNA 和 COII 基因（NCBI 数据库中的序列号分别为 KX129973 和 KX290714）的分子鉴定结合来保证白蚁物种鉴定的准确和严谨。

1.2　近暗散白蚁 β-葡糖苷酶基因的部分序列扩增

从采回的枯木中挑选成年工蚁置于干净平板内，平板置于冰上。按住白蚁头部，用解剖针从尾部轻轻将白蚁肠道拉出，解剖约 100 头后浸于 Trizol 试剂中，按 Invitrogen 的操作说明提取样品总 RNA。参考 One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis Kit（北京全式金生物科技有限公司）合成总 cDNA；根据SMARTer® RACE 5′/3′Kit（TaKaRa Clontech，日本）说明书合成 5′RACE 和 3′RACE cDNA。

根据前期等重标签标记（isobaric tags for relative and absolute quantitation，iTRAQ）蛋白组测序的结果（未发表），设计近暗散白蚁肠道内的 β-葡糖苷酶 7 基因的引物，F：5′-CATTGGGATCTGCCACAGCCTCTAC-3′；R：5′-GTTGTCAATTAGAGTCCACGCCG-3′。使用 TransStart FastPfu DNA Polymerase（北京全式金生物科技有限公司）进行 PCR 扩增，反应体系：cDNA 1 μL，正反向引物（10 μmol/L）各 1 μL，5 × TransStart FastPfu 缓冲液 10 μL，dNTPs（2.5 mmol/L）4 μL，TransStart FastPfu DNA 聚合酶 1 μL，无菌水补足 50 μL。反应程序：95℃预变性 2 min；95℃变性 20 s，55℃ 20 s，72℃延伸 1 min，循环 35 次；72℃保温 10 min。电泳检测后将之转入到 pEASY-Blunt Simple 克隆载体（北京全式金生物科技有限公司），转化筛选并提取质粒测序，得到部分序列。

1.3　RACE 扩增近暗散白蚁 β-葡糖苷酶基因的全长

由于用反转录扩增的蛋白序列不完整，仅有部分序列，因此使用 5′RACE 和 3′RACE 技术来获得该基因的全长序列。根据 1.2 节中得到的 β-葡糖苷酶 7 基因的部分序列，设计该基因的 5′RACE 和 3′RACE 特异性引物。5′RACE 引物序列：5′-GCTAGAACAGGATTGGTCCATCCACC-3′；3′RACE 引物序列：5′-CATTGGGATCTGCCACAGCCTCTAC-3′。以 1.2 节合成的近暗散白蚁肠道内容物 RACE cDNA 为模板，扩增其 5′端序列和 3′端序列。

5′RACE 的反应体系（25 μL）：1.2 节中制备的 5′RACE cDNA 1 μL，10 × Buffer 2.5 μL，LATaq 0.25 μL，5′RACE 引物（10 mmol/L）0.5 μL，UPM 2.5 μL，无菌水 17.25 μL。PCR 反应程序：94℃预变性 4 min；94℃变性 30 s，68℃ 30 s，72℃延伸 3 min，循环 35 次；72℃保温 10 min。3′RACE 的扩增体系、反应程序与 5′RACE 基本相同，仅将模板和引物换为 3′RACE cDNA 和 3′RACE 引物。通过琼脂糖凝胶（1.2%）电泳（DYY-6C 琼脂糖水平电泳仪，北京六一仪器厂）检测 PCR 产物，切割目的条带，送上海生物工程有限公司进行序列测定。测序成功后拼接序列，设计特异性引物 BG-ORF-F：5′-ATGGGGAGTGATAATTGGGCCACAGA-3′ 和 BG-ORF-R：5′-CTAAGAACTCTCGACACCCAGAAATTC-3′。以近暗散白蚁肠道内容物 cDNA 为模板，扩增其开放阅读框，PCR 的反应体系和反应程序同 1.2 节。反应结束后，如上述方法检测并送测。

1.4　序列分析和系统发育树的构建

使用 Blast 工具在 NCBI 数据库中进行 BLASTp 同源序列分析，选取同源性较高的不同昆虫的 β-葡糖苷酶，以黄粉虫 *Tenebrio molitor* 为外群，用 MEGA 7（7.0.14）软件，选择 Jones-Taylor-Thornton（JTT）模型，用最大似然法（maximum likelihood method）构建系统进化树进行聚类分析。在 Swiss-Model 网站（网址：https://swissmodel.expasy.org/）预测各个基因的 3D 模型；利用 pyMOL（http://www.pymol.org）对蛋白进行单体的 3D 结构预测；在 Expasy 网站（molecular weight）和等电点（isoelectric point）（网址：http://web.expasy.org/compute_pi/）计算蛋白的分子量；用 SignalP 4.1 Server（网址：http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/）分析蛋白质的信号肽。

1.5 表达载体构建及毕赤酵母的电转化

用 pPICZαA 胞外表达载体(Invitrogen,美国),去掉信号肽和终止密码子,设计引物引入 *Xho* Ⅰ 和 *Not* Ⅰ 两个酶切位点,BG-P-F：5′-CCGctcgagAAAAGAGCTTGGAACGAAGATGGTAAGGGCG-3′； BG-P-R：5′-AAAAGGAAAAgcggccgcAGAACTCTCGACACCCAGAAATTCTACAGG-3′(小写字母为酶切位点)。PCR 体系与程序同 1.2 节。空 pPICZαA 载体和回收后的 *RpBg*7 扩增片段用 *Xho* Ⅰ 和 *Not* Ⅰ 限制性消化酶(江苏愚公生命科技有限公司)进行双酶切,酶切体系：*Xho* Ⅰ 1 μL, *Not* Ⅰ 1 μL, 质粒 DNA 1 μg/DNA 片段 200 ng,高纯水补足 20 μL。37℃水浴 30 min,酶切后进行电泳和回收。用 T4 DNA 连接酶(NEB,美国)连接目的基因与空载体,连接体系：T4 DNA 连接酶 1 μL,用无菌水补足 20 μL,37℃连接 30 min。连接体系转化入大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α 感受态细胞中,挑选 PCR 结果正确的转化子,提取质粒并用双酶切验证,体系及条件同上。用 *Stu* Ⅰ(江苏愚公生命科技有限公司)线性化酶切处理融合质粒,电转入毕赤酵母 X-33 感受态细胞,电转条件:电压 1.5 kV,电容 25 μF,电阻 200 Ω,电击时间 5 ms。然后将转化后的液体涂布在博来霉素浓度为 500 μg/mL 的 YPDS(酵母粉 1%,胰蛋白胨 2%,葡萄糖 2%,琼脂粉 2% 和 1 mol/L 山梨醇)平板,挑选长势较好的单克隆进行验证。用酵母基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)提取转化子的基因组 DNA(提取步骤详见说明书)。用 5AOXI 引物(5′-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3′)与基因下游引物 BG-P-R 进行 PCR 验证,反应体系：酵母基因组 DNA 50 ng, 2 × Taq Mix 10 μL, 5AOX I (10 μmol/L) 0.4 μL, BG-P-R(10 μmol/L) 0.4 μL, 无菌水补足 20 μL。反应程序：94℃预变性 4 min; 94℃变性 30 s, 55℃ 30 s, 72℃延伸 1 min, 循环 32 次;72℃保温 10 min。

1.6 近暗散白蚁 β-葡糖苷酶在毕赤酵母中的表达及检测

为了诱导表达 β-葡糖苷酶表达,用博来霉素浓度为 100 μg/mL 的 50 mL BMGY 培养基培养 1.5 节获得的阳性转化子(为确保溶氧量,培养基体积最好不超过容器容积的 10%),30℃过夜培养 16 ~ 18 h。室温 1 500 g 离心 5 min 收集菌体。用博来霉素浓度为 100 μg/mL 的 50 mL BMMY 培养基重悬菌体,30℃培养。每 24 h 取样并补加甲醇至终浓度为 1% 诱导近暗散白蚁 β-葡糖苷酶的表达,7 d 后得到诱导表达菌液。对转化入空 pPICZαA 的 X-33 毕赤酵母进行同样的培养,作为后续实验的阴性对照。诱导表达菌液胞外分泌蛋白(extracellular secretion proteins)粗酶液的提取方法是,取 50 mL 的诱导菌液,4℃ 5 000 r/min离心 5 min,分离上清和菌体沉淀。上清中分次加入固体硫酸铵,一边搅拌一边加入,直至硫酸铵达到饱和。4℃ 12 000 g 离心 10 min,取沉淀用 10 mL 0.1 mol/L PBS 溶解,用 0.1 mol/L PBS 进行透析,透析 2 次,每次 3 h;透析后用 PEG 20000 浓缩至 5 mL,即得到诱导表达菌液的胞外分泌蛋白粗酶液。菌体胞内蛋白(extracellular proteins)的提取方法为,用 10 mL 无菌水彻底悬浮菌体,吸取菌液,4℃ 5 000 r/min 离心 5 min,弃上清,重复 3 次;向离心管中加入 650 μL 山梨醇 Buffer,再加入 50 U 酵母细胞破壁酶,30℃水浴 1 h,室温 4 000 r/min 离心 10 min,弃上清,收集沉淀,加入 1 mL 0.1 mol/L PBS(pH 7.4)清洗菌体沉淀,重复 3 次,再加入 0.8 mL 0.1 mol/L PBS(pH 7.4)收集沉淀,使用超声波细胞破碎仪破碎菌体,参数为功率 35%,工作 3 s,间歇 3 s,破碎 3 min,4℃ 10 000 r/min 离心 10 min,上清稀释至 5 mL,即得到胞内蛋白粗酶液。

用 10% SDS-PAGE 电泳检测胞外分泌蛋白粗酶液和胞内蛋白粗酶液中目的蛋白的表达情况,并用 4-硝基苯基-β-d-吡喃葡萄糖苷(4-nitrophenyl β-d-glucopyranoside, 4pNPG)作为底物测定 β-葡糖苷酶 7 的粗酶活性,同样条件培养的空 pPICZαA-X33 毕赤酵母的胞外分泌蛋白粗酶液或胞内蛋白粗酶液作为阴性对照。粗酶活性测定体系总体积为 200 μL,胞外分泌蛋白粗酶液或胞内蛋白粗酶液 50 μL, 50 μL 底物,100 μL pH 4.8 醋酸钠缓冲液,于 50℃水浴反应 10 min 后加入 3 mL 0.2 mol/L Na_2CO_3 终止反应。在 408 nm 处测量吸光度 A,根据公式 $A = \varepsilon bc$(A 为反应体系在 408 nm 处测量吸光度,pNP 的消光系数 $\varepsilon = 1.74 \times 10^{-4}$/mol·cm·mL,$b$ 为比色皿厚度,c 为 pNP 的浓度)计算产物 pNP 的浓度,从而得到葡萄糖的浓度。酶活性测定重复 3 次。酶活力单位(U)定义为 1 min 内生成 1 μmol 底物所需的酶量为一个酶活力单位。

2 结果

2.1 近暗散白蚁 β-葡糖苷酶基因序列及结构预测

PCR 结合 RACE 克隆获得了近暗散白蚁的一

个内源性 β-葡糖苷酶 7 基因序列（GenBank 登录号：MN944395），开放阅读框长 1 485 bp，编码 495 个氨基酸残基，经 Swiss-Model 建模其 3D 结构，该基因编码的蛋白是一个（α/β）8-TIM 桶装结构，在催化活性口袋内具有保守的碱性氨基酸残基 Glu187 和 Glu394，这些是糖苷水解酶 1（glycoside hydrolase 1，GH1）家族 β-葡糖苷酶的典型特征，因此认为其属于 GH1 家族，将该基因命名为 *RpBg7*。在 Expasy 网站预测 RpBg7 的分子量是 57 kD，等电点 5.51，不稳定系数为 38.4，SignalP 4.1 Server 分析 RpBg7 的信号肽位于第 1－42 位氨基酸。

使用 $Phyre^2$ 分析了蛋白的二级结构，发现该蛋白包含了 19 个 α 螺旋和 14 个 β 折叠。通过单体的 3D 结构预测并与恒春新白蚁的 β-葡糖苷酶 NkBg（GenBank 登录号：AB073638.2）进行了结构对比，发现两者的 3D 结构完全重合，均含有 GHF1 β-葡糖苷酶的典型（a/b）8-TIM 桶形褶皱。在 NCBI 数据库中进行 BLASTp 同源序列分析，近暗散白蚁的内源性 RpBg7 的氨基酸序列与其他 18 种昆虫的序列同源性较高，其中 RpBg7 的氨基酸序列与栖北散白蚁 *Reticulitermes speratus* 的 β-葡糖苷酶（GenBank 登录号：AB915866.1）序列一致性最高（88.33%）。其次是与台湾乳白蚁（GenBank 登录号：JN565079.1，86.46%）、黑翅土白蚁 *Odontotermes formosanus*（GenBank 登录号：GU591172.1，82.55%）和土垅锯白蚁 *Microcerotermes annandalei*（GenBank 登录号：KU170546.1，81.66%），与其余的物种同源蛋白氨基酸序列一致性均在 60% 以下（图 1）。结合序列比对的情况，我们推测第 187 和 394 位的谷氨酸（E）为其催化残基（图 1 中红色五角星号标注），催化酸/碱的 TXNEP 基序（X 是疏水性氨基酸残基）位于 β 折叠 6 的末端，催化的亲核体 I/VTENG 基序位于 β 折叠 11 的末端，这也是典型的 GHF1 家族的特征；第 39 位的谷氨酰胺（Q）、第 142 位的组氨酸（H）、第 143，436 和 444 位的色氨酸（W）、第 186 和 441 位的天冬氨酸（N）、第 330 位的苏氨酸（T）、第 443 和 450 位的谷氨酸（E）和第 452 位的苯丙氨酸（F）为糖苷的糖基结合囊（glycone-binding pockets）的残基（图 1 中绿色倒三角标注）；第 190 和 247 位的缬氨酸（V）、第 249 位的精氨酸（R）、第 331 位的酪氨酸（Y）、第 332 位的丙氨酸（A）和第 366 位的色氨酸（W）为糖基配基结合囊（aglycone-binding pockets）的残基（图 1 中蓝色圆点标注）。

2.2　近暗散白蚁 β-葡糖苷酶基因 *RpBg7* 的系统进化位置

利用 MEGA 7（7.0.14）软件，采用最大似然法进一步分析了近暗散白蚁 β-葡糖苷酶基因 *RpBg7* 的进化位置。我们以黄粉虫 *Tenebrio molitor* 为外群，将近暗散白蚁 RpBg7 氨基酸序列与 18 种昆虫的相近基因进行了进化树分析结果表明（图 2）。结果表明，近暗散白蚁 RpBg7 与栖北散白蚁的 β-葡糖苷酶的进化关系最近，其次是与台湾乳白蚁。但是同为散白蚁属的美洲散白蚁 *Reticulitermes flavipes* 却与近暗散白蚁关系较远，与格斯特乳白蚁 *Coptotermes gestroi* 和黄翅大白蚁 *Macrotermes barneyi* 进化关系比较近（图 2）。这与上述氨基酸序列分析同源性较高结果一致。

2.3　近暗散白蚁 β-葡糖苷酶 RpBg7 在毕赤酵母中表达及酶活性

从克隆载体 pPICZαA 上 PCR 扩增引入酶切位点的目的基因（图 3），从图中可以看出扩增效果较好，无非特异性条带，可以切胶回收。构建的 *RpBg7*-pPICZαA 重组质粒双酶切验证（图 3）显示载体已成功构建，经过测序显示无突变、移码和碱基增减等情况，确定连接成功，可以向毕赤酵母中转化。从图 3 可以看出融合表达质粒均被 *Stu* Ⅰ 完全切开，浓缩之后使用电转化法转化入毕赤酵母 X-33 感受态细胞中，筛选阳性转化子进行诱导表达。

使用 10% SDS-PAGE 电泳检测胞外分泌蛋白粗酶液和胞内蛋白粗酶液目的蛋白表达情况，发现胞内蛋白粗酶液在 57 kD 处有清楚的目的蛋白条带（图 4，红色箭头所示），而胞外分泌蛋白粗酶液未检测到目的条带（文中未显示）。用 pPNG 检测 RpBg7 在胞外分泌蛋白粗酶液和胞内蛋白粗酶液的酶活性，均可以检测到酶活性。发现 RpBg7 在胞外分泌蛋白粗酶液中的酶活性为 4.43 U，在胞内蛋白粗酶液中的酶活性为 7.47 U。

3　讨论

Cazy 数据库（http://www.cazy.org）将目前发现的 β-葡糖苷酶依据序列的一致性分成 GH1，GH3，GH5，GH9，GH30 和 GH116 共 6 个家族当中，目前发现的 β-葡糖苷酶多属于 GH1 和 GH3 家族。β-葡糖苷酶 GH1，GH5 和 GH30 家族属于 Clan A 超家族，酶结构呈保守的 $(\beta/\alpha)_8$ 桶状结构，催化通道呈口袋状。本实验克隆并表达了近暗散白蚁的

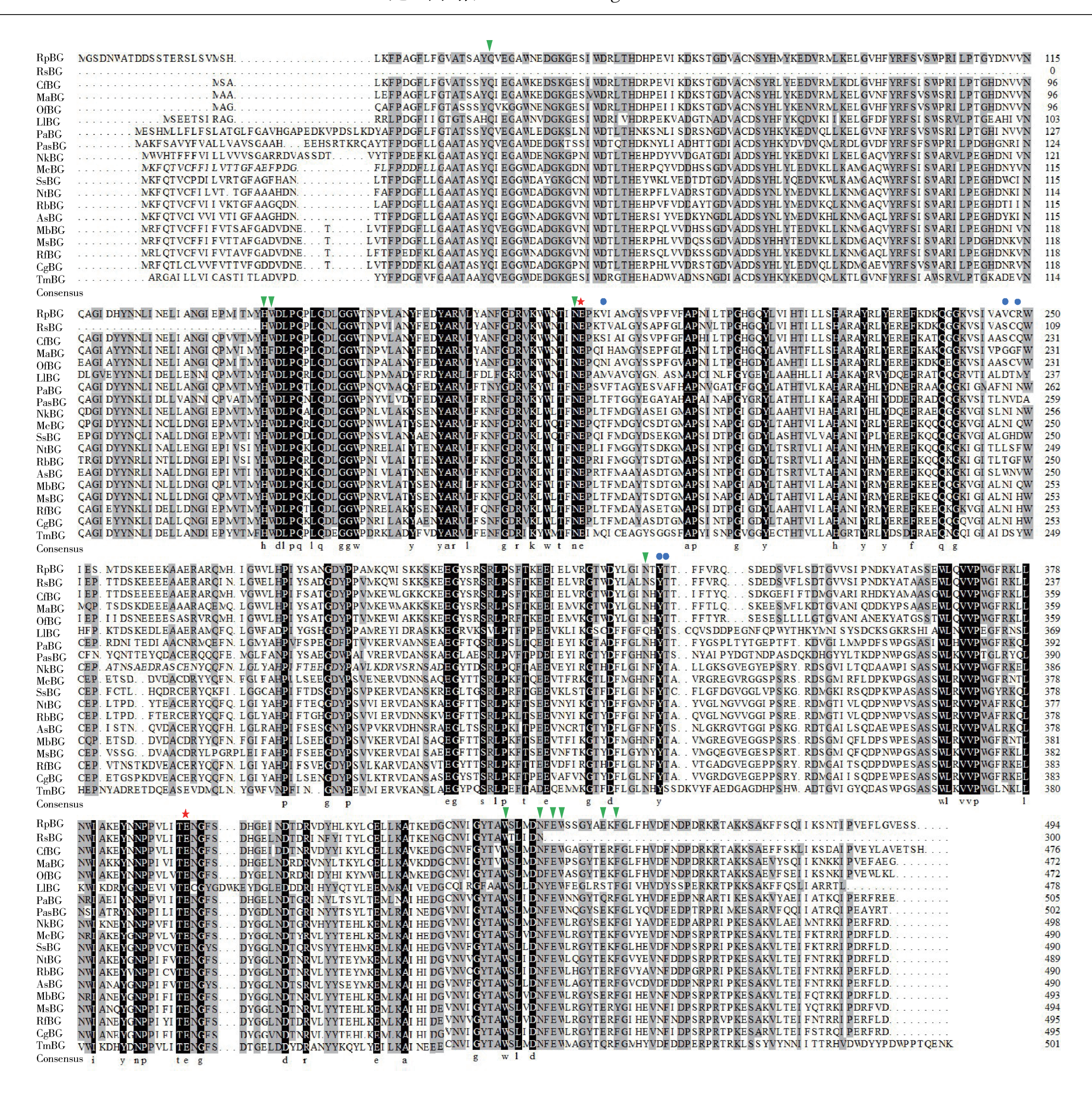


图 1 近暗散白蚁与其他昆虫 β-葡糖苷酶氨基酸的序列比对

Fig. 1 Multiple sequence alignment of β-glucosidase from *Reticulitermes perilucifugus* with the homologs from other insects

β-葡糖苷酶来源物种及其 GenBank 登录号 Origin species of β-glucosidases and their GenBank accession numbers: RpBG: 近暗散白蚁 *Reticulitermes perilucifugus*, MN944395; RsBG: 栖北散白蚁 *Reticulitermes speratus*, AB915866.1; CfBG: 台湾乳白蚁 *Coptotermes formosanus*, JN565079.1; MaBG: 土垅锯白蚁 *Microcerotermes annandalei*, KU170546.1; OfBG: 黑翅土白蚁 *Odontotermes formosanus*, GU591172.1; LlBG: 美国牧草盲蝽 *Lygus lineolaris*, KC702767.1; PaBG: 美洲大蠊 *Periplaneta americana*, KJ576835.1; PasBG: 黑褐硬蠊 *Panesthia angustipennis spadica*, LC125463.1; NkBG: 恒春新白蚁 *Neotermes koshunensis*, AB073638.2; McBG: 炭色大白蚁 *Macrotermes carbonarius*, KC533771.1; SsBG: 圆球白蚁 *Sphaerotermes sphaerothorax*, KC533773.1; NtBG: 高山象白蚁 *Nasutitermes takasagoensis*, AB508957.1; RbBG: 球形喙白蚁 *Rhynchotermes bulbinasus*, KC533772.1; AsBG: 施瓦兹无兵蚁 *Anoplotermes schwarzi*, KC533770.1; MbBG: 黄翅大白蚁 *Macrotermes barneyi*, JQ292845.1; 一种小白蚁 *Microtermes* sp., KP849477.1; RfBG: 美洲散白蚁 *Reticulitermes flavipes*, HM152540.1; CgBG: 格斯特乳白蚁 *Coptotermes gestroi*, KC891004.1; TmBG: 黄粉虫 *Tenebrio molitor*, AF312017.1. 红色五角星标示第 187 和 394 位的谷氨酸(E)为 RpBg7 的催化残基;绿色倒三角标示催化酸/碱的 TXNEP 基序(X 是疏水性氨基酸残基)位于 β 折叠 6 的末端,催化亲核体的 I/VTENG 基序位于 β 折叠 11 的末端,这也是典型的 GHF1 家族的特征;第 39 位的谷氨酰胺(Q)、第 142 位的组氨酸(H)、第 143, 436 和 444 位的色氨酸(W)、第 186 和 441 位的天冬氨酸(N)、第 330 位的苏氨酸(T)、第 443 和 450 位的谷氨酸(E)和第 452 位的苯丙氨酸(F)为糖基结合囊的残基。蓝色圆点标示第 190 和 247 位的缬氨酸(V)、第 249 位的精氨酸(R)、第 331 位的酪氨酸(Y)、第 332 位的丙氨酸(A)和第 366 位的色氨酸(W)为糖基配基结合囊的残基。Red pentacle indicates Glu187/394 (E), the catalytic residues of RpBg7. Inverted green triangle indicates the TXNEP motif catalyzing acid/base at the end of the β-fold 6, and the I/VTENG motif catalyzing nucleophile at the end of the β-fold 11, the typical characteristics of GHF1 family. Gln39(Q), His142(H), Trp143/436/444(W), Asp186/441(N), Thr330(T), Glu443/450(E), Phe452(F) are the residues of glycone-binding pockets. Blue dots indicate Val190/247(V), Arg249(R), Tyr331(Y), Gla332(A) and Trp366(W), the residues of aglycone-binding pockets.

内源性 β-葡糖苷酶 7 基因 *RpBg7*,通过其基因序列的生物信息学分析,发现该 β-葡糖苷酶是典型的 GH1 家族基因,具有 GH1 β-葡糖苷酶典型的(a/b) 8-TIM 桶形褶皱,即口袋状,GH1 催化活性位点包含

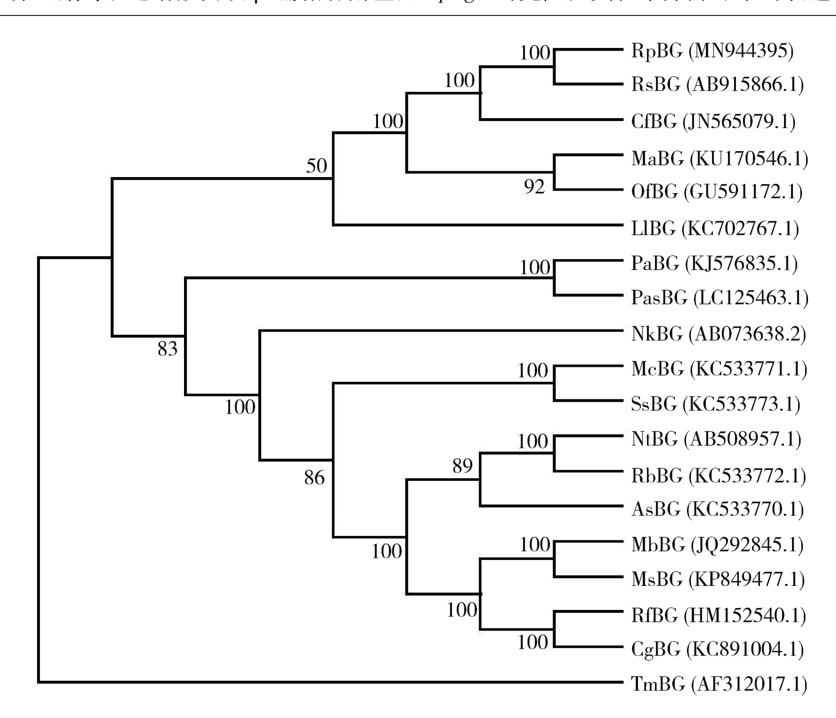


图 2　最大似然法构建的基于昆虫 β-葡糖苷酶氨基酸序列的系统进化树

Fig. 2　Phylogenetic tree of β-glucosidase in insects constructed by the maximum likelihood method based on amino acid sequences

图中昆虫 β-葡糖苷酶的来源物种见图 1。Origin species of β-glucosidase is the same as Fig. 1.

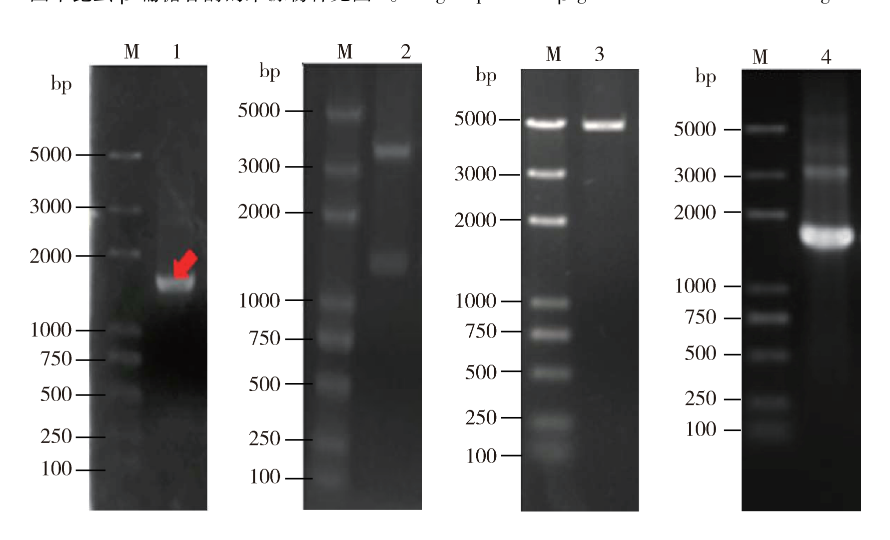


图 3　毕赤酵母表达载体 *RpBg*7-pPICZαA 验证

Fig. 3　Verification of *Pichia pastoris* expression vector *RpBg*7-pPICZαA

M：DNA 分子量标准 DNA molecular weight marker；1：*RpBg*7 PCR 扩增产物 PCR amplification product of *RpBg*7；2：*RpBg*7-pPICZαA 融合质粒双酶切 Double enzyme digestion of the fusion plasmid *RpBg*7-pPICZαA；3：*RpBg*7-pPICZαA 融合质粒 *Stu* Ⅰ线性化处理 Linearization of the fusion plasmid *RpBg*7-pPICZαA by *Stu* Ⅰ；4：*RpBg*7-pPICZαA-X33 转化子基因组 PCR 产物 Genomic PCR product of the transformant *RpBg*7-pPICZαA-X33.

两个保守的 Glu，靠近 N 端的 Glu 位于第 4 个 β 折叠片上，在催化反应时提供亲核基团，靠近 C 端的 Glu 位于第 7 个 β 折叠片上，在催化反应时提供质子（曹慧芳，2018）。因此推测，近暗散白蚁 β-葡糖苷酶 RpBg7 的催化位点是 Glu187 和 Glu394，也具有典型的糖苷的糖基结合囊的残基和糖基配基结合囊的残基。而 β-葡糖苷酶作用于纤维二糖在内的纤维寡糖，从非还原端切割产生单个的葡萄糖（Lynd *et al*., 2002；Liao *et al*., 2011），在纤维素酶的协同作用过程中，纤维二糖的堆积常常会反馈抑制 EG 和 CBH 的酶活性从而影响整个酶系的水解效率（Holtzapple *et al*., 1990），所以 β-葡糖苷酶是纤维素分解为二糖、再分解为单糖的酶解体系的关键限速酶。

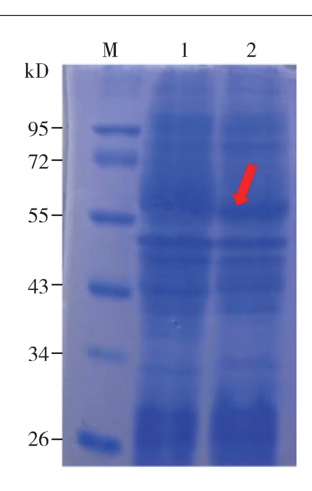


图 4 RpBg7 在毕赤酵母 X-33 中表达产物的 SDS-PAGE 鉴定结果

Fig. 4 SDS-PAGE identification results of the expression products of RpBg7 in *Pichia pastoris* X-33

M: 蛋白分子量标准 Protein molecular weight marker; 1: 空白 pPICZαA-X33 胞内蛋白 Intracellular protein of the blank pPICZαA-X33; 2: *RpBg7*-pPICZαA-X33 胞内蛋白(红色箭头所指) Intracellular proteins of *RpBg7*-pPICZαA-X33 (indicated by red arrow).

虽然在碳水化合物活性酶(CAZy)数据库和蛋白质数据库中可以找到很多的 β-葡糖苷酶,但是酶活性高、热稳定性好和葡萄糖耐受性强的却很少(Cantarel *et al.*, 2009; Cairns and Esen, 2010)。迄今为止,也有多种白蚁的内源性纤维素酶被表达,原始单酶活性均不高,比如黄翅大白蚁 β-1,4 内切葡聚糖酶的酶活性为 14.1 U/mL(杜娇等, 2019),在枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 中表达的黄翅大白蚁 β-葡糖苷酶活性为 0.21 U/mL;另外也有白蚁内生菌的分离,包括坚强芽孢杆菌 *Bacillus firms* 的纤维素内切酶(CMCase)活性是 95 U/mL(马玉俊等, 2019),黑胸散白蚁 *Reticulitermes chinensis* 肠道内共生枯草芽胞杆菌的 β-1,4 内切葡聚糖酶活性为 4.57 U/mL(王智伟等, 2018)。本研究克隆表达的 β-葡糖苷酶 7 在毕赤酵母中表达的酶活性为 7.47 U/mL(图 4),作为生物质转化的工业应用还远远不够,但是它是来源于天然生物材料的纤维素酶,可以与其他的天然生物系统中的纤维素酶高度协同作用于天然底物,另外也应该具有天然酶的酶学性质,比如温度、pH 值,尤其是对高糖底物的耐受性,都需要进一步研究以适应工业需要。

相对于白蚁的防御、生物材料、工程和进化方面的研究,目前人们理解最多的是白蚁的木质纤维素降解,包括白蚁的消化和肠道共生物的互作,及一些新的重组木质纤维素酶的重要应用。下一步对白蚁研究的焦点将集中在如下方面:一是白蚁自身消化的生物质预处理的进一步探索;二是预处理酶的开发,这些酶是针对于木质纤维素生物质的非纤维素成分(例如木质素和其他酚类成分),同时也包括混合酶的应用;三是在生物反应器中保护微生物和酶的抗氧化剂和解毒酶;最后是关于生物质消化的研究,最大的需求还是重组酶的应用策略,这包括淡化合成底物,而强调实际的木质纤维素物料,而且用更多测量底物消化的定量方法(Scharf, 2015)。

参考文献(References)

Anderson WF, Akin DE, 2008. Structural and chemical properties of grass lignocelluloses related to conversion for biofuels. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 35(5): 355-366.

Breznak JA, Brune A, 1994. Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites. *Annu. Rev. Entomol.*, 39: 453-487.

Brune A, 2014. Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts. *Nat. Rev. Microbiol.*, 12(3): 168-180.

Cairns JRK, Esen A, 2010. β-glucosidase. *Cell. Mol. Life Sci.*, 67(20): 3389-3405.

Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B, 2009. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Res.*, 37(Database issue): D233-D238.

Cao HF, 2018. Molecular Characterization and Glucose-Tolerance Molecular Modification of GH1 β-Glucosidase from *Alicyclobacillus* sp. A4. MSc Thesis, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing. [曹慧芳, 2018. 来源于 *Alicyclobacillus* sp. A4 的 GH1 家族 β-葡萄糖苷酶的克隆表达及葡萄糖耐受性分子改造. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文]

Du J, Jiang SZ, Wei JH, Shen YL, Ni JF, 2019. Co-expression of lignocellulase from termite and their endosymbionts. *Chin. J. Biotechnol.*, 35(2): 244-253. [杜娇, 姜淑喆, 未建华, 申玉龙, 倪金凤, 2019. 白蚁及其共生菌来源的 4 种木质纤维素酶的共表达. 生物工程学报, 35(2): 244-253]

Geib SM, Filley TR, Hatcher PG, Hoover K, Carlson JE, Jimenez-Gasco Mdel M, Nakagawa-Izumi A, Sleighter RL, Tien M, 2008. Lignin degradation in wood-feeding insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105(35): 12932-12937.

Holtzapple M, Cognata M, Shu Y, Hendrickson C, 1990. Inhibition of *Trichoderma reesei*, cellulase by sugars and solvents. *Biotechnol. Biol.*, 36(3): 275-287.

Horn SJ, Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Eijsink VG, 2012. Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnol. Biol.*, 5(1): 45.

Huang FS, Zhu SM, Ping ZM, He XS, Li GX, Gao DR, 2000. Fauna Sinica, Insecta, Vol. 17. Isoptera. Science Press, Beijing. 346-347. [黄复生, 朱世模, 平正明, 何秀松, 李桂祥, 高道蓉, 2000. 中国动物志, 昆虫纲, 第 17 卷. 等翅目. 北京: 科学出版社. 346-347]

Lange JP, 2007. Lignocellulose conversion: an introduction to chemistry, process and economics. *Biofuels Bioprod. Bioref.*, 1: 39－48.

Liao H, Zhang XZ, Rollin JA, Zhang YH, 2011. A minimal set of bacterial cellulases for consolidated bioprocessing of lignocellulose. *Biotechnol. J.*, 6(11): 1409－1418.

Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, Pretorius IS, 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 66(3): 506－577.

Ma YJ, Zhang K, Wang L, Zhang K, Zhang H, Wang XZ, Li J, Liang ZJ, Zhang JY, Li JX, 2019. Isolation and identification of cellulose-degrading bacteria in termite gut. *Acta Veterin. Zootech. Sin.*, 50(9): 1951－1954. [马玉俊, 张凯, 王磊, 张康, 张宏, 王学智, 李杰, 梁子敬, 张景艳, 李建喜, 2019. 白蚁肠道纤维素降解菌的分离和鉴定. 畜牧兽医学报, 50(9): 1951－1954]

Ni J, Tokuda G, 2013. Lignocellulose-degrading enzymes from termites and their symbiotic microbiota. *Biotechnol. Adv.*, 31(6): 838－850.

Ohkuma M, 2003. Termite symbiotic systems: efficient bio-recycling of lignocellulose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 61(1): 1－9.

Ragauskas AJ, Williams CK, Davison BH, Britovsek G, Cairney J, Eckert CA, Frederick WJJr, Hallett JP, Leak DJ, Liotta CL, Mielenz JR, Murphy R, Templer R, Tschaplinski T, 2006. The path forward for biofuels and biomaterials. *Science*, 311(5760): 484－489.

Scharf ME, 2015. Termites as targets and models for biotechnology. *Annu. Rev. Entomol.*, 60: 77－102.

Scharf ME, Boucias DG, 2010. Potential of termite-based biomass pretreatment strategies for use in bioethanol production. *Insect Sci.*, 17(3): 166－174.

Scharf ME, Karl ZJ, Sethi A, Boucias DG, 2011. Multiple levels of synergistic collaboration in termite lignocellulose digestion. *PLoS ONE*, 6(7): e21709.

Scharf ME, Tartar A, 2008. Termite digestomes as sources for novel lignocellulases. *Biofuels Bioprod. Bioref.*, 2(6): 540－552.

Sethi A, Slack JM, Kovaleva ES, Buchman GW, Scharf ME, 2013. Lignin-associated metagene expression in a lignocellulose-digesting termite. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 43(1): 91－101.

Wang ZW, Zhou XM, Yang YX Chen YL, 2018. Screening of cellulolytic microorganisms from the *Reticulitermes chinensis* and identification of cellulase gene and its prokaryotic expression. *J. Agric. Biotechnol.*, 26(8): 1275－1287. [王智伟, 周小敏, 杨雨鑫, 陈玉林, 2018. 黑胸散白蚁体内产纤维素酶细菌的筛选及其纤维素酶基因的鉴定与原核表达. 农业生物技术学报, 26(8): 1275－1287]

Yang B, Wyman CE, 2008. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels Bioprod. Bioref.*, 2(1): 26－40.

（责任编辑：马丽萍）